

B. 研究方法

慢性ウイルス潜伏感染における SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強効果を検証するため、以前のワクチン接種後の SIV チャレンジ実験で SIV 複製がコントロールされたアカゲサル 2 頭を用いた。この 2 頭では、ウイルス血症は検出限界以下であり、慢性 SIV 潜伏感染の状態となっていた。この 2 頭のサルの感染慢性期 (SIV 感染後約 1 年) に、Gag 抗原発現 SeV (SeV-Gag) ベクターを経鼻接種した。接種直前および接種後 1 週目の末梢血リンパ球を用いて、ペプチド刺激後のインターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、抗原特異的 CTL 反応を測定した。

核内蛋白 Tat 抗原特異的 CTL 反応測定系の確認のため、SIV 感染サルの末梢血リンパ球を用いて、Tat オーバーラッピングによる抗原刺激後のインターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、Tat 抗原特異的 CTL 反応を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、医薬基盤研究所および国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。組換え生物等を用いる実験については、第二種使用等拡散防止措置確認 (大臣確認) および機関承認済みである。

C. 研究結果

SeV-Gag ベクター接種に用いたアカゲサル 2 頭では、SIV チャレンジ前のワクチン接種後、Gag206-216 エピトープおよび Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 反応が誘導されたが、感染慢性期にはこれらの CTL 反応レベルは低下し、SeV-Gag ベクター接種直前の末梢血リンパ球を用いた解析では、検出限界付近あるいはそれ以下であった。SeV-Gag ベクター接種後 1 週目の末梢血リンパ球を用いた解析では、Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL 反応の増強が認められた (図 1)。また、別の SIV 感染サルの末梢血リンパ球を用いた解析では、Tat 抗原特異的 CTL 反応が測定できた。

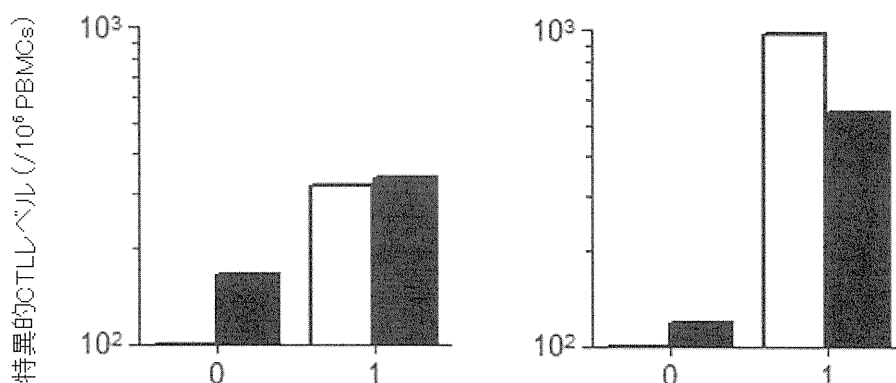


図 1. 感染慢性期の SeV ベクターワクチンの抗原特異的 CTL 誘導能

ワクチン接種後の SIV チャレンジでウイルス複製がコントロールされたサル 2 頭を用い、その感染慢性期に SIV Gag 発現 SeV ベクターを経鼻接種した。これらのサルでは、ワクチンにより Gag206-216 エピトープおよび Gag241-249 エピトープ特異的 CTL が誘導されたが、感染慢性期の SeV ベクター接種時 (0) には、これらの CTL 反応は検出限界以下あるいはボーダーラインとなっていた。SeV ベクター接種後 1 週目 (1) には、Gag206-216 特異的 CTL (白) および Gag241-249 特異的 CTL (黒) 反応の効率よい誘導が認められた。

D. 考 察

これまで、SeV ベクターの優れた抗原特異的 CTL 反応誘導能を報告してきたが、本研究では、ウイルス潜伏感染慢性期にウイルス抗原特異的 CTL 反応が検出限界付近となっている状況での SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強能をサルにて確認した。また、核内蛋白 Tax 抗原と類似の局在・機能性を示す Tat 抗原特異的 CTL 反応測定を行った。平成 24 年度以降は、これらの手法を用い、HTLV-1 の各種抗原特異的 CTL 反応の解析を行い、HTLV-1 感染発症防御に結びつく CTL の標的抗原の検討を進める計画である。

E. 結 論

CTL 増強のためのデリバリーシステムとして有用と考えられる SeV ベクターのサルへの経鼻接種実験により、ウイルス潜伏感染慢性期の抗原特異的 CTL 増強能を確認した。また、標的抗原候補の一つである Tax 抗原と類似の局在を示す Tat 抗原特異的 CTL 反応の測定法を確認した。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55:768-773, 2011.
- 2) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more

immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.

- 3) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.

2 学会発表

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/13/2011.
- 2) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- 3) 栗原京子、高原悠佑、原裕人、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. センダイウイルスベクターワクチンの経鼻接種と筋肉内接種の併用効果の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

微量抗体検出法の開発と抗原エピトープの決定に向けた基盤研究

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学 教授

研究協力者 松永 智子 横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨 HTLV-1 感染者は日本国内に依然として 100 万人を超えており、大都市部を中心に感染者が増加傾向にある。しかしながら、HTLV-1 感染症に対し、感染を防御したり発症を阻止できる有効な治療薬やワクチンは開発されていない。また、患者血清中の微量の抗体を検出し、有効なワクチンエピトープを決定するための優れたアッセイ系は構築されていない。我々は、HTLV-1 がコードするすべての全長タンパク質を、生理活性を保持した状態で合成し、感染者および感染モデルマウス血清中の微量抗体の検出が可能なアッセイ系の構築を目指している。本年度は、HTLV-1 遺伝子をヒトコドンで最適化した人工 cDNA を合成し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化標識された HTLV-1 全長タンパク質の合成および可溶化の検討を行った。現在のところ Rex, p27, Tax, p30, HBZ, Gag の 6 つの全長タンパク質の合成および可溶化が確認できている。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) の感染によっておこる感染症であり、感染者 (キャリア) の中から成人 T 細胞白血病やリンパ腫 (ATL) などの血液系の悪性疾患や HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy:HAM) 等の重篤な神経疾患が引き起こされる。特に乳幼児における母乳からの感染や、年長者や老人における上記疾患の発症予防法の開発に向けた基礎研究を進めることは重要である。しかしながら、HTLV-1 の感染を防御したり、ATL の発症を予防するワクチンは実用化されていない。今回、我々は、HTLV-1 ワクチンの開発や抗原エピトープの決定に向け、コムギ無細胞系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成を行い、血清中の微量抗体の検出法の開発のための実験を行った。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 ATK-1 (HTLV1A) がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27L, p30II) について、ヒトコドンに最適化した人工遺伝子を合成した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、コムギ無細胞タンパク質合成系の発現ベクターである pEU-E01-bls-S1 にサブクローニングした (bls: biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS)。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型に、SPu primer および AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、コムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、

下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を加えることにより行った。

2. HTLV-1 全長タンパク質の発現確認および定量

合成されたタンパク質は、Western Blotting により Streptavidin-HRP を用いて検出した。タンパク質の可溶化は、タンパク質合成液を 15000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min で遠心し、その上清を回収、泳動することで確認した。可溶化が困難であった Gag, TAX-1, HBZ タンパク質に関して、ZnCl₂ や界面活性剤 Brij35 をタンパク質合成中に加え、タンパク質の可溶化条件を検討した。

タンパク質の定量は、作製した SDS-PAGE にアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS (Wako, 178-00551) で染色した。ゲルはルミノ・イメージ・アナライザー-LAS-3000 (FULIFILM) でスキャンし、汎用解析ソフト Multi Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒトおよび動物検体を使用した実験は実施していないが、今後の臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者（感染者）の同意を得た上で行う予定である。

C. 研究結果

1. 無細胞系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 タンパク質の合成を効率化するために、ヒトコドンに最適化した人工 HTLV-1

遺伝子を合成した。次に真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント HTLV-1 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-bl-S1s ベクターにコムギ無細胞系タンパク質合成系を用いてビオチン付加 HTLV-1 タンパク質の合成を行った。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型にスプリットプライマー法を用いて nested PCR により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、コムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を添加した。合成したビオチン化タンパク質を遠心分離後、SDS-PAGE で泳動し、ストレプトアビジン-HRP を用いて検出を行った。その結果、7 種類の全ての全長タンパク質の合成が確認された。収量としては 1~2 マイクログラム/150 マイクロリットルと、通常のタンパク質とほぼ同様の合成効率を確保できた。また、ビオチン化効率も 50%以上の合成タンパク質で認められ、今後のアッセイ系の構築に本法が活用できることが確認された。

2. HTLV-1 全長タンパク質の可溶化の検討

次にタンパク質の可溶化を検討するため、ビオチン化全長タンパク質を、ストレプトアビジンセファロースビーズによるカラム法を用いて簡易精製した。次に可溶化および非可溶化分画を回収し、ウエスタンブロットを行った。その結果、Gag、HBZ および Tax タンパク質の可溶性がきわめて低いことが判明した。そこで、合成したタンパク質に塩化亜鉛および界面活性剤である Brij35 を各濃度で添加し、可溶化を試みた。その結果、Tax は 1 μ M の塩化亜鉛により、また、HBZ は 0.05% の Brij35 の添加により顕著に可溶性が亢進することが判明した。特に HBZ の可溶化率は 40~50%程度に上昇した。上記の検討により、

Rex, p27, Tax, p30, HBZ, Gag の 6 つの全長タンパク質が可溶化できた。今後はこの手法を用いて、HTLV-1 タンパク質の大量合成を実施するとともに、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイである AlphaScreen を用いて、血清中の微量抗体の測定法の開発を行う予定である。

D. 考察

我々は、コムギ無細胞タンパク質合成システムを活用し、全長 HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。このシステムは、真核型の無細胞タンパク質生産であるため、真核細胞に発現するタンパク質を自由に生産することが可能である。特にウイルス由来のタンパク質の生産においては、従来の大腸菌や昆虫細胞を用いた発現系より高い実績が示されている。本法によるタンパク質発現系では、キャップ構造非依存型の翻訳エンハンサーおよびポリ A 非依存型 3' 非翻訳配列の探索結果に基づいた転写鋳型 mRNA がデザインされており、PCR 法を利用した自由にタグの融合が実施できる点が優れている。また、真核細胞特有のタンパク質フォールディングが施行されるため、抗原タンパク質の作製に有利であると考えられる。

E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成システムを活用し、HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。その結果、Rex, p27, Tax, p30, HBZ, Gag の 6 つの全長タンパク質の合成および可溶化が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura

H. Effects of DNA Binding of the Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on the Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry*, in press.

- 2) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, and Kimura H,: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness, *BMC Infect Dis*, 11: 168 2011.
- 3) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, and Kimura H,: The impact of Saffold coronavirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata Japan, *Scand J Infect Dis*, 43: 669-671 2011.
- 4) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee S, W, and Ryo A,: A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency, *J Biol Chem*, 286: 11593-11603 2011.

2. 学会発表等

- 1) Miyakawa K, Nishi M, Yamamoto N, Ryo A: The Tumor Suppressor APC Regulates HIV-1 Assembly and Release. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- 2) Matsunaga S, Furukawa A, Kojima Y, Morishita R, Sawasaki T, Takaori-kondo A, Sugiura W, Katahira M, Ryo A: An in vitro

- cleavage assay system for XMRV protease by wheat-germ cell free protein production. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- 3) Kanuma T, Kudoh A, Jounai N, Takeshita F, Sawasaki T, Ryo A: Immune evasion by HIV-1 protease-mediated cleavage of TBK1. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- 4) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Kimura H, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A: Identification of SCYL2 as an interferon-inducible antagonist of HIV-1 Vpu. 6th German- Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22, 2011.
- 5) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Sugiura S, Sato H, Ryo A: An in vitro cleavage assay system for retrovirus protease by wheat germ cell-free protein production. 6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22, 2011.
- 6) 松永智子, 澤崎達也, 小島良績, 森下 了, 佐藤裕徳, 大出裕高, 杉浦 互, 梁 明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析. 日本プロテオーム学会, 2011年7月28~29日, 新潟.
- 7) 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山本直樹, 梁明秀: Posttranslational modification of HIV-1 Vpu in an innate antiviral response. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 2011年11月30日~12月1日, 東京.
- 8) 梁 明秀: HIV-1 粒子産生を規定する宿主制御因子の探索. 平成23年度遺伝子病制御研究所研究集会「感染・免疫・炎症・発癌」, 2011年12月5日~12月6日, 北海道.

G. 知的所有権の取得状況

なし

ワクチン評価の為の免疫老化モデルマウスの研究

研究分担者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科 講師

研究要旨 成人T細胞白血病・リンパ腫（ATL）や HTLV-1 関連脊髄症（HTLV-1 associated myelopathy:HAM）等の HTLV-1 関連疾患は、HTLV-1 感染者（キャリア）に 50 年近い潜伏期を経て発症する重篤な疾患であり、感染予防や発症予防を目的とした有効なワクチン開発が望まれている。発症予防ワクチンの接種対象者には、成年期以降のキャリアが多く含まれるが、小児と成人や老年者ではワクチン効果に相違が見られることがしばしば遭遇され、HTLV-1 関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効なウイルス抗原の網羅的解析が必要となる。本年は免疫応答の加齢による変化に関して、プロテアソームの機能異常という着眼点に基づき、基礎的な検討を行った。プロテアソームはタンパク質分解酵素複合体であり、MHC class I 分子に提示されるペプチド産生やサイトカイン産生など、生体免疫応答に重要な役割を果たすことが知られている。加齢によりプロテアソーム機能が減弱することから、プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス（老化マウスモデル、 $\beta 5t$ -Tg）を用い、免疫学的解析を行った。その結果、 $\beta 5t$ -Tg では CD4/CD8 比の増加や CD8+ T 細胞機能の低下を認め、いわゆる免疫老化に類似した異常を呈している可能性が示された。今後は、本老化マウスモデルを用い、ワクチン効果の影響を明らかにする。

A. 研究目的

HTLV-I の感染予防および発症予防ワクチンを開発することを目的とする。有効なワクチンが開発されることで、感染者の減少、有効な治療法が未だ確立されていない HTLV-I 関連疾患の発症予防が期待される。

B. 研究方法

1. マウス

$\beta 5t$ -Tg の作製には、発現プロモーター pCAGGS (CMV-IE、chicken β -actin、rabbit β -globin) を用い、C57BL/6J (B6) をバックグラウンドとして、マウス $\beta 5t$ cDNA を全身発現するトランスジェニックマウスの作製をオ

リエントル酵母(株)に委託した。実験には雄性 $\beta 5t$ -Tg と雌性 B6 野生型 (wild type; WT) マウスを交配した F1 マウスを用いた。コントロールマウスは 4~24 週齢の雄性 B6 WT マウスを三共ラボより購入した。

2. 細胞分離

$\beta 5t$ -Tg および WT マウスを犠牲死させ、脾臓を摘出し、セルスクレーパー (BD Falcon) と 100 μ m のセルストレイナー (BD Falcon) を用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。細胞浮遊液に抗体を反応させ、MACS (Magnetic activated cell sorting, Miltenyi Biotec) により分離した。分離した細胞の純度はフローサイトメトリーにより確認した。

3. フローサイトメトリー

各週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ および WT マウスより採血を行い、犠牲死後に脾臓、胸腺を摘出した。末梢血は溶血後に一次抗体を添加し、 4°C で 30 分染色し、洗浄した後にフローサイトメトリーによる解析を行った。脾臓、胸腺はセルスクレーパーと $100\mu\text{m}$ のセルストレイナーを用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。PBS 浮遊細胞を溶血後、一次抗体を添加し、 4°C で 30 分染色し、洗浄した後にフローサイトメトリーによる解析を行った。フローサイトメトリーは FACS Calibur (BD Bioscience) を使い、Cell Quest software (BD Bioscience) でデータを解析した。抗体は PE-conjugated anti-mouse CD4、FITC-conjugated anti-mouse CD8、PerCP-conjugated anti-mouse CD3、PE-Cy5-conjugated anti-mouse TCR β 、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD69 (いずれも BD Bioscience) とそれに対応するアイソタイプコントロールを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス末梢血の解析

4~24 週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス末梢血の白血球数、リンパ球数、T 細胞分画について、フローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、白血球数、リンパ球数に $\beta 5t\text{-Tg}$ と WT マウス間に有意な差は認めなかった。CD3+ T 細胞を検討した結果では一部の週齢で有意差が観察されたが、一定の傾向がなく、4~24 週齢のマウス全体で両群のデータを比較した結果では有意差は認めなかった。その一方で、T 細胞を CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けて CD4/CD8 比を解析した結果では、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスで有意に CD4/CD8 比が増加していた。

2. $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス脾細胞の解析

4~24 週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス脾細胞の CD3+ T 細胞についてフローサイトメトリーで検討した結果では、 $\beta 5t\text{-Tg}$ と WT マウス間に有意な差は認めなかった。しかしながら、脾細胞中の T 細胞を CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けて CD4/CD8 比を解析した結果では、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスで有意に比が増加していた。

3. $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞の解析

4~24 週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞の分画について、double negative (DN) 細胞、double positive (DP) 細胞、CD4+ SP 細胞、CD8+ SP 細胞に分けて解析した。その結果、DN 細胞の割合に $\beta 5t\text{-Tg}$ と WT マウス間で有意な差は認めなかった。その一方、4~12 週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞では DP 細胞が増加し、CD8+ SP 細胞が減少する傾向にあった。CD4+ SP 細胞に関しては、 $\beta 5t\text{-Tg}$ と WT マウス間に有意差はなかったが、4 週や 8 週齢の $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスにおいて CD4+ SP 細胞の割合が減少している傾向が認められた。CD4/CD8 比を算出した結果では、末梢血や脾細胞と同様に $\beta 5t\text{-Tg}$ マウスで有意な比の増加が認められた。

4. $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞における TCR β 発現の解析

T 細胞受容体 β 鎖 (T cell receptor β chain; TCR β) は胸腺細胞の分化に従って発現し、成熟した SP 胸腺細胞では高い TCR β の発現を示す。 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞における TCR β の発現をフローサイトメトリーにより解析した。TCR β 発現の強さにより 3 段階 (dim, low, med+high) に分けて解析した結果、 $\beta 5t\text{-Tg}$ マウス胸腺細胞では TCR β 発現が低い CD8+ SP 細胞の割合が増加し、中等度~高発現を示す CD8+ SP 細胞が減少していることが明らかとなった。そのような TCR β 発現の低下は CD8+ SP 細胞に特異的であり、DP 細胞や CD4+ SP 細胞では WT マウスと同程度の発現が観察された。

5. $\beta 5t$ -Tg マウス胸腺細胞における CD69 発現の解析

CD69 分子は早期活性化マーカーとしてリンパ球活性化の指標として広く用いられている。また、胸腺では分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現が認められることから、 $\beta 5t$ -Tg マウス胸腺細胞のセレクションの状態を検討するために、CD69 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、 $\beta 5t$ -Tg マウス胸腺細胞の DP 細胞や CD8+ SP 細胞では CD69 の発現低下が認められ、 $\beta 5t$ -Tg マウスでは CD8+ SP 細胞の分化成熟の異常があることが考えられた。

D. 考察

免疫応答の加齢による変化に関して、プロテアソームの機能異常という着眼点に基づき、基礎的な検討を行った。その結果、プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス（老化マウスモデル、 $\beta 5t$ -Tg）では CD4/CD8 比の増加や CD8+ T 細胞機能の低下を認め、いわゆる免疫老化に類似した異常を呈している可能性が示された。

E. 結論

$\beta 5t$ -Tg マウスはプロテアソームの機能異常による免疫応答の変化を解析できる有用なモデルであると考えられる。今後は、本老化マウスモデルを用い、ワクチン効果の影響を明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fc γ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes.

Cytometry A 79(1): 46-56, 2011.

- 2) Watari H, Michimata R, Yasuda M, Ishizu A, Tomaru U, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N. High prevalence of multiple human papillomavirus infection in Japanese patients with invasive uterine cervical cancer. Pathobiology 78(4): 220-226, 2011.

- 3) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Marukawa K, Matsuno Y, Kasahara M. Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors. Am J Surg Pathol 35(9): 1296-1304, 2011.

- 4) Sutoh Y, Kondo M, Ohta Y, Ota T, Tomaru U, Flajnik MF, Kasahara M. Comparative genomic analysis of the proteasome $\beta 5t$ subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. Immunogenetics 64(1): 49-58, 2012.

- 5) Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. Am J Pathol 180: 963-972, 2012.

2. 学会発表

- 1) 脇 雅, 桜沢貴代, 飯沼千景, 山口まどか, 外丸詩野, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応性 T 細胞による血管炎発症モデル. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
- 2) 中沢大悟, 長谷川梨沙, 一條加奈, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋. プロピルチルウラシル (PTU) 投与による MPO-ANCA 関連血管炎のモデル開発と

- 病態解析. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
- 3) 益田紗季子, 岩崎沙理, 佐藤樹里, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. Fcγ受容体を介した trogocytosis の意義と制御機構の解析. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 4) 山田洋介, 外丸詩野, 木内隆之, 高橋里実, 石津明洋, 松野吉宏, 笠原正典. プロテアソーム機能の低下と喫煙負荷がもたらす老化関連呼吸器系疾患の病態解明. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 5) 高橋里実, 外丸詩野, 合田 文, 小野綾子, 小原次郎, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. プロテアソームの機能異常による病理作用: 脂質代謝や脂肪肝との関連性について. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 6) 松井由希, 深谷進司, 外丸詩野, 渥美達也, 笠原正典, 石津明洋. TNFα 変換酵素の過剰発現による炎症・線維化病態への影響. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 7) 木内隆之, 高田明生, 池田 仁, 外丸詩野, 石津明洋. von Recklinghausen 病による動脈破裂の病理組織学的検討 (第二報). 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 8) 小原次郎, 外丸詩野, 鈴木小百合, 高橋里実, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの異所性発現による T 細胞分化の異常. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011.
 - 9) 外丸詩野, 山田洋介, 木内隆之, 丸川活司, 松野吉宏, 黒田 徹, 石津明洋, 笠原正典. プロテアソームサブユニット β5t の胸腺腫における発現. 第 57 回日本病理学会秋期特別総会, 東京, 2011.
 - 10) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性 T 細胞による血管炎発症モデル. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2011.
 - 11) 山口まどか, 一條加奈, 飯沼千景, 脇雅, 川上 愛, 佐々木直美, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応性血管炎惹起性 T 細胞の認識分子の同定. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 千葉, 2011.
 - 12) 山田洋介, 大塚紀幸, 大平 洋, 辻野一三, 深谷進司, 外丸詩野, 石津明洋. Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) の一剖検例. 第 16 回血管病理研究会, 神戸, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける ATL 様病態と抗 HTLV-1 免疫

研究分担者 田中 正和 関西医科大学微生物学講座 助教

研究要旨 抗 HTLV-1 感染細胞ワクチン開発に向け、HTLV-1 感染個体の病態およびヒト免疫系を再現するマウスモデルの開発を試みた。そのため、ヒト臍帯血より単離した CD133⁺造血幹細胞を NOG マウス骨髄内に移植することで個体内にヒト造血系を再構築したヒト化マウスを作成し、同マウス腹腔内に γ 線照射 HTLV-1 感染細胞を投与することで、マウス個体内ヒト T リンパ球に HTLV-1 を感染させた。その結果、感染直後から末梢血におけるヒト T リンパ球細胞の異常増殖が観察され、感染数ヶ月では限られた数の感染クローンを主体とする CD4+CD25+T リンパ球による脾腫の発症と、ATL に特徴的な花弁様分葉核を持つ T リンパ球の末梢血への出現が観察された。一方、感染ヒト化マウス血清中には抗 HTLV-1 IgM および IgG 抗体の産生が見られ、脾臓では Tax 特異的 CTL の発現を確認することができた。以上の結果から、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおいて ATL 様病態と抗 HTLV-1 ヒト宿主免疫系が再現できたことから、ヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチン開発における動物モデルとしての利用が期待される。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、主に乳児期におけるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell Leukemia Virus type 1:HTLV-1) の感染の後、数十年の潜伏期を経て感染者の数%において発症するが、有効な治療法は未だ確立されていない。従って ATL 治療法のみならず、発症予防への取り組みは重要な課題である。

抗 HTLV-1 感染細胞ワクチンが最も有効な発症予防のひとつに考えられるが、HTLV-1 はヒト以外の動物への感染が難しく、また感染が成立する場合も、宿主免疫制御機構がヒトと必ずしも一致しないことが問題視されていた。

そこで我々は抗 HTLV-1 感染細胞ワクチンの開発を目的として、ヒト免疫系を再現した

小動物における HTLV-1 感染系の樹立を試みた。そのため本研究においては、まず免疫不全マウスにヒト臍帯血を骨髄内に移植することでヒト血球系を有するヒト化マウスを作製し、次に同個体に HTLV-1 を感染させ、感染個体内における感染細胞の動態および病態変化を観察した。さらに、同感染ヒト化マウス個体内における抗 HTLV-1 宿主免疫の有無およびウイルス感染細胞との動的平衡を検証することを旨とした。

B. 研究方法

1. ヒト化マウスの作製

京阪臍帯血バンクより申請・審査の後提供された研究用臍帯血より CD133 陽性細胞分離磁気ビーズを用いて造血幹細胞 (CD133 陽性

細胞)を分離した。CD133 陰性細胞から抽出した DNA を用いて HLA 型を決定した HLA-A24⁺の CD133 陽性細胞 5x10⁴ 個を、予め 5Gy の γ 線全身照射処置した 7 週齢 NOG-SCID マウス大腿骨骨髓内へ移植した。移植 1 ヶ月後に骨髓細胞を一部採取し FACS にて CD45 陽性ヒト骨髓細胞の生着および分化を測定・確認した。

2. HTLV-1 の感染

骨髓移植 4 ヶ月時に、末梢血における CD3 陽性ヒト T リンパ球の発現を確認後、同ヒト化マウス腹腔内に放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染 MT-2 細胞 2.5x10⁶ 個を接種した。MT-2 細胞接種後、2 週間毎に末梢血を採取し、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数の計測を定量的 PCR 法にて行った。感染ヒト化マウスは体重の減少を指標に供死し、脾臓および各種浸潤臓器における感染細胞の解析を行った。

3. FACS

蛍光標識された各種抗ヒト血球表面抗原抗体 (CD45、CD19、CD33、CD14、CD1a、CD4、CD8、CD25、CD45RO、CD45RA) を用いてフローサイトメトリー (BD FACS Canto™II: BD) を行い、骨髓、末梢血および脾臓中の血球細胞の種類および表面抗原の発現変化を解析した。

4. 感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA をカラム法 (PureLink Genomic DNA Mini Kit: Invitrogen) にて分離し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的とした TaMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。また同時に内部標準として human β -globin 遺

伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

5. 感染細胞のクローナリティ解析

脾臓からゲノム DNA を抽出し、inverse PCR 法により HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を含む PCR 断片を増幅した。PCR 断片のアガロースゲル電気泳動像から、各感染個体における感染細胞クローンの多寡を判断した。特定の感染クローンが大部分を占めていると判断された検体に関しては、PCR 断片をプラスミドにクローニングし、組み込み部位の宿主ゲノム塩基配列情報をもとに定量的 PCR を行い各感染クローンの占有率を算出した。

6. HTLV-1 抗体価

HTLV-1 抗体測定は、ゼラチン凝集 (PA) 法 (富士レビオ) を用いて解析した。

7. CTL 測定

抗原特異的 CTL 細胞集団の検出・定量は蛍光標識 HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 テトラマー (MBL) を用いフローサイトメトリー法で解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は京阪さい帯血バンクにおいて、提供者の同意の下に採取されたもののうち、移植に用いられないロットを使用している。研究内容および倫理項目を審査、許可された後に研究用として提供されている。

また動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を提出し、審査の後承認されている。

C. 研究結果

1. ヒト化マウスにおけるヒト血球細胞の増殖・分化

γ 線全身照射 (5Gy) 処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨骨髓内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 (5×10^4 個) を注入・移植したところ、2 ヶ月後には骨髓中に 90%以上の効率で CD45 陽性ヒト血球細胞の生着が達成された。さらに、血球分化特異抗体を用いて骨髓内のヒト血球系細胞を解析した結果、B 細胞、骨髓系前駆細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞の分化・増殖が確認された。さらに移植 4 カ月後においては、末梢血中に CD4 および CD8 陽性の CD3 陽性成熟 T 細胞がヒト正常個体と同等の CD4/CD8 比で発現しており、CD45RO 陽性メモリー T 細胞への分化も確認された。

2. ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

末梢血中にヒト T 細胞が確認された段階のヒト化マウス (骨髓移植 4 ヶ月後) 腹腔内へ HTLV-1 感染細胞である MT-2 細胞 (2.5×10^6 細胞数) を放射線処理 (10Gy) 後に接種し、HTLV-1 感染を行った。感染 2 週間から末梢血 CD3 陽性ヒト T 細胞数の増大が観察され、感染 2~3 カ月で 100 倍以上にまで達した。肝臓ならびに脾臓の腫大も観察され、末梢血には異型リンパ球数の出現が見られた。さらに感染 4 カ月以降では、ATL 患者末梢血で特徴的に見られる花弁様分葉核を持つ細胞が観察された。

3. クローナル増殖の検討

HTLV-1 感染によりヒト化マウス末梢血 CD3 陽性ヒト T 細胞数の増加と平行して、ヒト T 細胞における HTLV-1 プロウイルス量も増大した。さらに、ATL 細胞に特徴的な CD25 陽性 CD4 細胞画分の T 細胞における割合も経

時的に増加し、感染 4 ヶ月で 80~90%に達した。

次にこの感染 T 細胞のクローナル増殖の有無を確認するため、組み込み部位を増幅した Inverse long-PCR 法を用いて解析した。PCR 産物の電気泳動では、マウス個体内で感染が進むにつれて、ポリクローナルな増殖から、複数の感染クローンが選択的に増殖しているポリクローナル増殖を示唆する結果が得られた。そこで得られたバンドをプラスミドにクローニングし、プロウイルス組み込み部位周辺のヒトゲノム塩基配列を決定後、定量的 PCR 法を用いてそれぞれのクローンの占有率を解析した。その結果、感染初期においてはそれぞれのクローン占有率が 1%以下であるのに対し、花弁様分葉核が認められた感染 4 カ月以降では、特定の感染クローンが 30%以上を占めていることが明らかとなった。

4. 抗 HTLV-1 抗体の産生

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 ヒト宿主免疫の発現を確認するため、まず血清中における抗 HTLV-1 抗体の産生を測定した。PA 法 HTLV-1 抗体測定キット (富士レビオ社製) を用いて抗 HTLV-1 gag 抗体価を測定したところ、感染 4 週で抗体価が最高 1000 倍にまで上昇した後減少し、一部の個体において 8 週目以降に次のピークが得られた。IgM から IgG へのクラススイッチを想定されたため、この時期の血清に対して抗ヒト IgM および抗ヒト IgG 抗体を用いた吸収実験を行なったところ、それぞれ抗体価が半分にまで減少し、抗 HTLV-1 gag IgG 抗体の発現が確認された。

5. Tax 特異的 CTL の発現

HTLV-1 感染ヒト個体においては、抗 Tax CTL が HTLV-1 感染細胞に対する主要な宿主

免疫を担うことか報告されていることから、HLA-A*2402 造血幹細胞で作成した HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける Tax CTL の発現を蛍光標識 HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 テトラマーを用いて定量した。その結果、脾臓 CD8 T 細胞の 1%前後が陽性を示し、感染ヒト個体末梢血と同等の結果が得られた。さらに、Tax ペプチドを添加同一マウス脾臓細胞由来フィーダー細胞との共培養ではテトラマー結合細胞が 20%以上にまで上昇し、同マウス体内における機能的抗 Tax CTL の存在が確認された。

D. 考察

ヒト造血幹細胞の NOG マウス骨髄内移植法により作成したヒト化マウスは、これまで報告されている種々のヒト化マウスと比較し、ヒト造血細胞の生着率および T 細胞の分化・維持の程度において優れていることが示唆された。同ヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることにより、感染 CD25 陽性 CD4 T 細胞の異常増殖に加え、ATL に特徴的である花弁様分葉核を持った T リンパ球の出現を見たことから、ATL の病態の多くを再現していると考えられる。

さらに、感染の経過とともに特定の感染クローン選択が進む一方、抗 HTLV-1 免疫の成立が確認されたことから、感染個体内における感染細胞と宿主免疫との平衡関係が成立している可能性が強く示唆された。

E. 結論

本実験の成果より、HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いることで、DNA ワクチンや樹状細胞ワクチン等の抗 HTLV-1 宿主免疫の活性化による感染個体内ウイルス感染細胞の抑制を

介した ATL 発症予防法の開発に向けた個体レベルでの検討が可能になると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka M, Nitta T, Sun B, Fujisawa J, Miwa M. The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice. *Exp Thr Med*. 2: 89-94, 2011.
- 2) 田中正和、ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について(ラクトフェリン学会賞受賞研究). ラクトフェリンニューズレター. 第 1 巻 p8-9, 2011.
- 3) 田中正和、鄭真美、長谷川翔、和田直樹、橋本岩男、津田洋幸、藤澤順一、三輪正直. ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について. ラクトフェリン 2011, p14-20, 2011.
- 4) Tsuda M, Tanaka M, Mushiake M, Takahashi J, Tanaka K, Watase J, Fujisawa JI, Miwa M. A novel pathway of centrosome amplification that dose not require DNA lesions. *Cancer Sci* 103: 191-196, 2012.

2. 学会発表

国際学会

- 1) JI Fujisawa, K Teduka, R Xun, M Tei, N Takenouchi, M Tanaka: ATL-like overgrowth and clonal expansion of HTLV-1 infected CD25+ CD4+ T-lymphocyte in humanized-NOG mouse model. 15th International conference on human retrovirology HTLV and related viruses, 4-8th June, 2011 (Belgium)
- 2) K Teduka, R Xun, M Tei, T Ueno, M Tanaka,

- N Takenouchi, JI Fujisawa: Inverse correlation between Tax and CD25 expressions in HTLV-1 infected CD4 T-cells in vivo. 15th International conference on human retrovirology HTLV and related viruses, 4-8th June, 2011 (Belgium)
- 3) T Ueno, K Teduka, R Xun, M Tei, M Tanaka, N Takenouchi, JI Fujisawa: Infection of defective virus correlated with the induction of CD25 positive CD4 T-cell during early phase of infection in humanized mouse model. The Unlimited World of Microbes, XV International Congress of Virology, 11-16 September 2011 (Sapporo)
- 4) K Teduka, R Xun, M Tei, T Ueno, M Tanaka, N Takenouchi, JI Fujisawa: Inverse correlation between tax and CD25 expressions in HTLV-1 infected CD4+ T-cells *in vivo*. The Unlimited World of Microbes, XV International Congress of Virology, 11-16 September 2011 (Sapporo)
- の検討. がん予防大会 2011 (京都) 2011年6月20日～21日
- 4) G You, S Honjo, L Zeng, H Tanaka, E Ohta, T Fujii, M Tanaka, M Miwa: Genetic polymorphisms and environmental determinants on cancer risk of carcinogenesis of cholangiocarcinoma in Thailand. がん予防大会 2011 (京都) 2011年6月20日～21日
- 5) 手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤澤、田中正和、藤澤順一: HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルにおける CD25 陽性 CD4 T 細胞集団の解析. 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 (東京) 2011 年 9 月 18 日～19 日
- 6) 田中正和、和田直樹、橋本岩雄、長谷川翔、津田洋幸、三輪正直、藤澤順一: ウシラクトフェリン投与による HTLV-1 腫瘍抑制効果の検討. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2011 年 10 月 3 日～5 日

国内学会

- 1) 田中正和、津田雅貴、高橋淳、塚田匡輝、虫明正敏、山田真生、藤澤順一、三輪正直: DNA 損傷を起こさない化合物による中心体増幅経路の存在. 第 58 回日本生化学会近畿支部例会 (大阪) 2011 年 5 月 21 日
- 2) 和田直樹、田中正和、橋本岩男、竹之内徳博、三輪正直、藤澤順一: ウシラクトフェリン投与による HTLV-1 腫瘍抑制効果の検討. がん予防大会 2011、2011 年 6 月 20 日～21 日 (京都)
- 3) 塚田匡輝、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一、園田俊郎、三輪正直: 緑茶投与による HTLV-1 感染細胞特異的な抑制効果
- 7) 手塚健太、上野孝治、荀潤澤、竹之内徳博、田中正和、藤澤順一: HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける欠損型プロウイルスの解析. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2011 年 10 月 3 日～5 日
- 8) 寺田佳優、虫明正敏、高橋淳、藤井貴弘、田中正和、三輪正直: ポリ ADP-リボシル化の阻害と中心体増幅の関係. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 13 日～16 日
- 9) 高橋淳、虫明正敏、津田雅貴、田中正和、三輪正直: Effect of inhibition of polyADP-ribosylation on cell proliferation. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜)

2011年12月13日～16日

- 10) 三輪正直、田中正和: DNA 損傷を必要としない新しい中心体増幅経路. 第3回中心体研究会 (東京) 2011年12月17日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中正和、 鄭真美、 長谷川翔、 和田直樹、 橋本岩男、 津田洋幸、 藤澤順一、 三輪正直	ウシラクトフェリンによるHTLV-1抗腫瘍効果について	日本ラクトフェリン学会第4回学術集会実行委員会	ラクトフェリン2011	日本医学館	東京	2011	8-9

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, <u>Hasegawa H</u> , Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	<i>ACS Chem Biol</i>	Jan 13	Epub ahead of print	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, <u>Hasegawa H</u> .	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	<i>J Med Virol</i>	84(2)	336-344	2012
Nakajima N, Sato Y, Katano H, <u>Hasegawa H</u> , Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H,	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	<i>Mod Pathol</i>	25(1)	1-13 (Epub 2011 Aug 26)	2012

Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.					
Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H.	Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response.	<i>PLoS One</i>	6(10)	e26163 (Epub 2011 Oct 14)	2011
Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H.	A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	414(4)	719-726 (Epub 2011 Oct 6)	2011
Sutoh Y, Kondo M, Ohta Y, Ota T, Tomaru U, Flajnik MF, Kasahara M.	Comparative genomic analysis of the proteasome $\beta 5t$ subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes.	<i>Immunogenetics</i>	64(1)	49-58	2012
Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M.	Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities.	<i>Am J Pathol</i>	180	963-972	2012
Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A.	Plasma-dependent, antibody- and Fc γ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes.	<i>Cytometry A</i>	79(1)	46-56	2011
Watari H, Michimata R, Yasuda M, Ishizu A, Tomaru U, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N.	High prevalence of multiple human papillomavirus infection in Japanese patients with invasive uterine cervical cancer.	<i>Pathobiology</i>	78(4)	220-226	2011

Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Marukawa K, Matsuno Y, Kasahara M.	Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors.	<i>Am J Surg Pathol</i>	35(9)	1296-1304	2011
Tanaka M, Nitta T, Sun B, Fujisawa J, Miwa M	The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice.	<i>Exp Thr Med</i>	2	89-94	2011
Tsuda M, Tanaka M, Mushiake M, Takahashi J, Tanaka K, Watase J, Fujisawa JI, Miwa M	A Novel pathway of centrosome amplification that dose not require DNA lesions.	<i>Cancer Sci</i>	103	191-196	2011
Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T	Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques.	<i>J Virol</i>	86	738-745	2012
Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S	Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques.	<i>Microbiol Immunol</i>	55	768-773	2011
Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A,	Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies.	<i>Vaccine</i>	29	8557-8563	2011